

学校编码: 10384
学号: 21720061152250

分类号__密级__
UDC__

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

鸡 *Sizzled* 基因的表达分析及
基因沉默后的表型研究

Chicken *Sizzled* Expression Analysis and
Embryo phenotype Research after *Sizzled* Silence

汪妍

指导教师姓名: 袁立教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: __评阅人: __200 年月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ☒ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘要.....	V
Abstract.....	VI
前言	1
1.1 血管发育	1
1.2 Sizzled 的结构和功能	3
1.2.1 Sizzled 的发现过程	3
1.2.2 鸡 Sizzled 基因的结构特点	3
1.2.3 Sizzled 基因功能及其信号通路的研究	7
1.3 RCAS 载体系统介绍	8
1.4 本实验的研究目的和结果	9
第一章 鸡 sizzled 的表达分析.....	11
1. 实验材料和仪器	11
2. 实验方法	15
3. 实验结果和分析	22
3.1 鸡 Sizzled 的动态表达分析	22
3.2 内皮前体细胞分离和纯度鉴定	23
3.3 抗体制备的实验方法	25
3.4 双重免疫组化分析内皮细胞表达 sizzled	28
第二章 鸡 sizzled 的 RCAS 干扰病毒制备	29
1. 实验试剂和仪器	29
2. 实验方法	31
3. 实验结果	36

4. 结果分析	39
第三章 RCAS 病毒注射活体鸡胚实验和分子机制初步分析	40
1. 实验试剂和器材	40
2. 实验方法	41
3. 实验结果和分析	43
第一部分病毒注射鸡胚实验	43
3.1 统计分析胚胎异常表型数量	43
3.2 全胚胎免疫组化检测病毒感染部位	44
3.3 胚胎发育障碍明显表型	44
3.4 三日龄胚胎血管发育变化	46
3.5 四日龄胚胎血管发育变化	46
3.6 五日龄胚胎血管发育变化	48
3.7 六日龄胚胎血管发育变化	48
3.8 八日龄胚胎血管发育变化	49
3.9 六日胚胎全景显示血管发育情况	50
4.0 四日龄鸡胚局部发育图示	50
4.1 AngioSys1.0 分析卵黄囊血管变化	52
第二部分 分子机制的初步分析	53
4.2 Real-time 检测与血管相关基因表达	53
讨论	55
问题与展望	57
参考文献	58
致谢	60

CONTENTS

Abstract (Chinese version)	V
Abstract (English version)	VI
Perface	1
1.1 Vasculature	1
1.2 Chicken Sizzled structure and function	3
1.2.1 Discovery of Sizzled	3
1.2.2 Chicken Sizzled character	3
1.2.3 Research of Sizzled function and signal pathway	7
1.3 Introduction of RCAS system	8
1.4 The research porpose and meaning	9
Chapter 1 The Chicken <i>Sizzled</i> expression analysis	11
1. Material and Instrument	11
2. Methods	15
3. Result and Analysis	22
3.1 Chicken Sizzled dynamic expression analysis	22
3.2 Endothelial cell isolation and Identification	23
3.3 Antibody prepatation	25
3.4 Double immunostaining analysis sizzled expression in endothelial cells	28
Chapter 2 RCAS-shRNA-sizzled virus preparation	29
1. Material and Instrument	29
2. Methods	31
3. Result	36
4. Analysis	39

Chapter 3 In vitro analysis embryo phenotype and primary	
mechanism analysis.....	40
1. Material and Instrument.....	40
2. Method	41
3. Result and Analysis.....	43
Part 1 RCAS infection chicken embryo	43
3.1 Statistic abnormal embryo numbers.....	43
3.2 Immuno staining infection site.....	44
3.3 Embryo abnormal phenotype.....	44
3.4 Embryo vessel phenotype 3 Day	46
3.5 Embryo vessel phenotype 4 Day	46
3.6 Embryo vessel phenotype 5 Day	48
3.7 Embryo vessel phenotype 6 Day	48
3.8 Embryo vessel phenotype 8 Day	49
3.9 The Whole Egg panorama 6 Day.....	50
4. 0 Part vessel phenotype 4 Day.....	50
4.1 AngioSys1.0 for vessel parameter.....	52
Part 2 Molecular mechanism analysis.....	53
4.2 Real-time analysis endothelial cell related genes	53
Discussion.....	55
Prospects	57
References	58
Acknowledgement.....	60

摘要

功能血管的正常形成涉及到多个基因家族之间信号通路的协调控制,近二十年来,血管生物学领域的研究取得了许多新的突破,勾勒出血管系统形成中细胞与分子发育机制的基本轮廓。但对血管内皮细胞的分化机制,尤其是控制部分中胚层细胞向血管内皮前体细胞分化的机制,仍不明确,还需要更多的分析和研究数据作为支撑^[1, 2]。研究在内皮前体细胞中表达的基因,对于揭示血管生成起着积极的指导作用。

通过 cDNA 消减杂交技术,我们从发育至三个体节鸡胚后区部位中分离到一些可能在内皮前体细胞中特异表达的基因。其中最多克隆的是一个在高等哺乳动物中未发现新基因,该基因经同源性比对后,发现与爪蟾 *Sizzled* (*xSizzled*),斑马鱼 *Ogon* 基因高度同源,我们称它为鸡 *Sizzled* (*cSizzled*)。初步的基因表达检测表明该基因表达部位与内皮前体细胞的发生部位重叠,我们推断它与血管内皮细胞分化和血管发育相关。本研究旨在完成对这一新发现基因的表达和功能分析,期望能揭示血管内皮细胞分化和血管系统发育的新机制。

工作内容: 1) *sizzled* 基因在发育鸡胚中的动态表达分析。2) 分离内皮细胞, *sizzled* 抗体制备,双重免疫组化分析内皮细胞是否表达 *sizzled*。3) 制备 RCAS-shRNA-*sizzled* 干扰病毒。4) 病毒感染 18~24h 鸡胚,表型分析。5) *Sizzled* 相关基因 *Bmp2*, *Colloid*, *GATA2* 等表达分析。

实验结果: *cSizzled* 在胚胎发育至 3 体节以前,表达部位与内皮前体细胞发生部位重叠。在我们分离的血管内皮细胞上,也检测到 *cSizzled* 的表达。为研究 *cSizzled* 功能,制备 RNAi 病毒感染早期鸡胚的 *sizzled* 表达部位,在发育后期出现卵黄囊血管发育不良,分支减少,胚胎脑部发育不良等现象。初步表明, *Sizzled* 在血管等系统的发育过程中,发挥一定作用。

关键词: 鸡 *Sizzled*; 血管系统发育; 鸡胚; RNA 干扰

Abstract

The vascular system is indispensable for normal metabolism and functions of all organs and tissues in the way that it distributes nutrients and removes metabolic wastes. This system is in fact the first function organ system for higher organisms. Its development consists of multiple processes including vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis.

The formation of the functional vasculature is achieved by intricate control of multiple gene families. In the last two decades, breaking-throughs in the field of vascular biology have distinctly sketched out the mechanisms of the vascular development with the integration of crucial signaling pathways into the process of vessel formation. However, little progress has been made for mechanisms concerning the endothelial cell differentiation; and it is also not clear how angioblasts are differentiated from mesoderm cells

By using cDNA subtractive technology, we have cloned some genes possibly specific to angioblasts and endothelial cells from 24h chicken embryos. The gene most frequently appeared, represent a gene that has not been found in mammals, but share higher homologous to *Xenopus Sizzled* (*xSizzled*) and zebrafish *Sizzled* (*Ogon*) than the *Crecent*, a gene in fowls most closed to *xSizzled*. We named the gene chicken *Sizzled*(*cSizzled*) as chicken ortholog of *xSizzled*. Primary *in situ* hybridization results revealed that the gene is expressed in the position overlapping the place where the hemangioblasts or angioblasts emerge. We thus assumed that this gene is possibly involved in the differentiation of endothelial cells in the process of the vascular system development. The present study aims to exam the dynamic expression and function of this gene in hoping to provide new understanding to the mechanisms of endothelial cell differentiation and vascular development.

Experiment: 1) *cSizzled* dynamic expression analysis; 2) Chicken endothelial cell isolation, and double immunostaining analysis of *cSizzled* expression with *sizzled* and VEGFR2 antibody; 3) RCAS-shRNA-*Sizzled* preparation; 4) *Sizzled* RNAi in

chicken embryo.

Results: *cSizzled* is expressed in the site where the endothelial progenitor cells emerge before 3-somite stage; *cSizzled* is also detected in the isolated vessel endothelial progenitor cells; With The RNAi treatment achieved by RCAS vector virus infection, the chicken embryos display decreased number and enlarged diameter of vessels in the yolk sac vessel and malformation of the brain. Therefore, the study revealed for the first time roles of the *cSizzled* in the development of the vascular system and brain.

Key words: chicken Sizzled; vascular development; chicken embryo; RNAi

前言

血管遍布于动物全身，承担输送养分和清除代谢废物的重要功能。机体任何组织器官的正常代谢与功能发挥，都离不开这一系统的正常功能。临床实践中，除心血管系统本身的疾病占据数一数二的重要位置外，血管生长异常也是众多其他器官系统疾病中最为棘手的问题之一。因此掌握血管生长发育的调控机制，具有重大的理论与实际意义。伴随对人类健康的更加关注，医疗卫生领域投入的加强与科学技术手段的更新，血管生物学领域的研究将持续深入^[2]。

1.1 血管发育

血管系统的发育包括血管发生（vasculogenesis），血管生成（Angiogenesis，亦作血管新生）和动脉生成（Ateriogenesis）等多种过程^[3]。在胚胎发育至三胚层阶段，位于中胚层的造血前体细胞(hemogenoblasts)和内皮前体祖细胞(angioblasts)从中胚层分化，迁移到指定的位置。经过一系列增殖、极化、聚集和分化过程，形成仅由内皮细胞组成的由胚体主动脉、主要静脉原基和以之相连的蜂窝状初始毛细血管组成的血管网络，这个过程称为血管发生。随着发育继续进行，废用的血管被剪除，新的血管分支通过出芽或嵌入性方式生成，经过多次的血管重建过程，最终形成由多级血管组成的功能血管系统，称为血管新生（Angiogenesis）。随后，已存在的血管丛的侧枝血管扩大，形成较大血管，通过这些过程，血管的生长最终形成有各级动、静脉和毛细血管组成的复杂网络系统^[4]。

功能血管的正常形成涉及到多个基因家族之间信号通路的协调控制，近二十年来，血管生物学领域的研究取得了许多新的突破，使得我们对血管系统形成细胞与分子机制的认识更加深入。尽管今天，我们已能更清楚地勾画出血管系统发育的细胞与分子机制的基本轮廓。但对于血管系统生长发育中心细胞即血管内皮细胞的分化机制还需要更多的了解，控制部分中胚层细胞向血管内皮前体细胞分化的机制仍然不明确。为了探讨血管内皮细胞分化机制，我们从三体节鸡胚后区的细胞中，以 VEGFR2 标记分离血管内皮前体细胞，建立了这些细胞特异表达 cDNA 消减文库（相对同区的 VEGFR2 阴性细胞）。这些克隆所代表的可能是在血管内

皮及其前体细胞“特异性”（至少在特定时期相对 VEGFR2 阴性细胞来说应该是这样的）表达的候选基因，在血管内皮细胞分化及血管生成中起重要作用。在所获得的分子克隆中，重复性最高的克隆是一个在高等哺乳动物中未发现新基因，该基因经同源性比对后，发现它与爪蟾 *Sizzled* (*xSizzled*)，斑马鱼 *Ogon/sizzled* 基因高度同源，我们称之为鸡 *Sizzled* (*cSizzled*)。初步的基因表达检测该基因表达部位与内皮前体细胞的发生部位重叠，我们推断它与血管内皮细胞分化和血管发育相关。本研究旨在完成基因的表达和功能分析，期望揭示血管内皮细胞分化和血管系统发育的新机制。

1.2 Sizzled 的结构和功能

1.2.1 *Sizzled* 的发现过程

Sizzled 基因最早是 1997 年 Kirschner, M.W. 等人在非洲爪蟾 (*Xenopus*) 中发现, 它与 *Frizzled* 受体的胞外半胱氨酸富集区高度同源, 因而得名为分泌型 *Frizzled* 即 (Secreted Frizzled)。它也因此和其他有类似结构的分泌型 *Frizzled* 相关蛋白 (secreted Frizzled proteins, sFRPs) 归为一类^[5]。sFRP 通过与 *Frizzled* 竞争性与 Wnt 结合而抑制 Wnt 信号向细胞内传递。但近期研究表明 *Sizzled* 基因并不直接参与 Wnt 信号通路, 而是通过 BMP 信号通路中发挥调控胚胎背腹发育的功能。*Sizzled* 目前在低等后口动物如非洲爪蟾 (*Xenopus*), 墨西哥钝口螈 (*Ambystoma mexicanum*), 斑马鱼 (*Zebrafish*), 绿色河豚 (*Tetraodon nigroviridis*), 鸟类鹌鹑 (*Quail*), 斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*) 中都有发现 (信息来自 NCBI 核苷酸比对)。但在高等哺乳类动物和原口动物中均未发现^{[6][7]}。

1.2.2 鸡 *Sizzled* 基因的结构特点

鸡的 *Sizzled* (chicken *Sizzled*) 包含 871 个碱基, 编码 286 个氨基酸。与在爪蟾和斑马鱼的 *Sizzled* 比较可知, 其 N 端接近 150 个氨基酸是半胱氨酸富集区的 FZ 结构域。在 sFRPs、羧肽酶 Z (CPZ)、跨膜丝氨酸蛋白酶、受体酪氨酸激酶、Ror 家族和肌肉特异性激酶等家族都存在该结构域; c*Sizzled* 的 C 端近 120 氨基酸为 NTR 结构域, 在 Netrin 分子的 C 末端、补体蛋白 C3, C4, C5 和原胶原 C 蛋白酶增强子蛋白, 以及 sFRPs 等家族中都存在 (来源 NCBI 蛋白比对)。利用 Clustalw 进行核苷酸多重比对, c*Sizzled* 与爪蟾的 x*Sizzled* 同源性达 49%, 与斑马鱼 z*Sizzled* 同源性为 41% (见图 1)。氨基酸同源性比较, 与爪蟾氨基酸同源性 67%, 与斑马鱼氨基酸同源性为 45% (见图 2)。c*Sizzled* 基因 N 端的半胱氨酸保守区比对, 与爪蟾氨基酸同源性为 78%, 与斑马鱼同源性 60% (未显示)。进行基因组定位分析发现, 它与爪蟾相同, 基因都定位在 MAPK12 和 TRABD 基因之间, 说明 c*Sizzled* 与 x*Sizzled* 高度同源^[6]。

cSizzled ---GTTGACTGCAAAAATACTTGTTCCTGCTGAGTGTTTCCTAGGAGTGGGCACAAG 57
xSizzled ---CTCGAGCATGACTGGAGTCTTCCTGCTCCTCTGCGCCTCCATGCTGGCCGCCGCCGC 57
zSizzled GTCTTCAGTGATGTCTATTCTAGTCTGCTGCTGTTTCTCTCTCGCGGCCACACCGG 60
 * * * * *

cSizzled ---TTTGACATTGGATTATCCACCAATGTGTAGTGATACCAAGGAGATGGACATGTG 114
xSizzled ---CTTGACATTGGATTATCCACCAAGTGCCTTCCCATTCCCAAAGAGATGGCCATGTG 114
zSizzled AGCCTTCGACCTGGGCCAGACCACCGCTGCGTCCCCATCCCGCCACAGATGAGCGTCTG 120
 ** *** * ** ***** ** ** ** ** ** ***** * * **

cSizzled CCACGAGATTGGGTACTCCGAAATGAGGCTTCCCAACCTGATGGGACACACAAGCATGGC 174
xSizzled CAATGACGTCGGCTACTCGGAGATGCGGTTGCCAAACCTGTTGGGACACACTAACATGGC 174
zSizzled CCAGGATGTCCGCTACTCAGAGATGCGTTTACCAACCTGCTGGGTACGGCAGTCTGGA 180
 * * * * * ** ** * * * * * * * * * * *

cSizzled AGAGGTCGTCCTAAATCCACCACCTGGCAGCACCTGGTGACACGGACTGTCACCTCA 234
xSizzled AGAAGTCGTGCCAAGTCAGCAGAGTGGCAGAACCTCTACAGACCGGCTGCCACCCCTA 234
zSizzled GGAAGCGGCTCCTCGATCTGACGACTTGAGGACCCTGCTGCACACTGGCTGTCACCCGCA 240
 * * * * * ** * * * * * * * * * * *

cSizzled TGTGAGGATGTTCTGTGCTCTGTGTTGCACCCATCTGCCTGGACACGTTTCATCCATCC 294
xSizzled TGCCAGGACCTTCTATGCTCCCTATTCGCCCCAGTCTGCCTGGACACGTTTCATCCAGCC 294
zSizzled GGCCCGGGCTTCTGCTGCTCGCTATCGCCCTGTATGCCTCGACAGGTTTCATCCAGCC 300
 * * * * * * * * * * * * * * * * *

cSizzled CTGTAGGAGTATGTGCGTTGGTGTTCGGGACAGCTGCGCGCCTGTACTTGCTGCCATGG 354
xSizzled CTGCCGAGCATGTGTGTGCTGTAAGAAACAGTTGTGCTCCAGTTCTGGCATGTCATGG 354
zSizzled ATGCCGAGTGTGTGTTTGGCAGTAAAGGAGAGCTGCAGTCCCGTTCTAGCCTGTCACGG 360
 * * * * * * * * * * * * * * * * *

cSizzled GCACACCTGGCCAGAAAGCCTGGACTGCAACCGTTCCCTGCAGACGAGGACATGTGTCT 414
xSizzled GCACTCCTGGCCTGAGAGCTTAGACTGTGACAGGTTCCAGCTGGGGAAGACATGTGTCT 414
zSizzled ACACTCCTGGCCTGAATCACTAAATTGTGAGCGATTCCC---GGAGCAGGACGACTGTCT 417
 *** ***** * * * * * * * * * * *

cSizzled GGCATCGCTTACAAAGGAATACAAATACTT-GCACAAAGTCCTACCGAAGCCTGCATGCC 473
xSizzled GGACACTCTCAGCAAAGAGTATCAGTATGC-CTATAAAGAACTGCCAAAGCCAAGCTGCC 473
zSizzled GACGCCGTGCCAAACA-CATCAGTGCTTCTCCAAAGAGTCCCTCAGCCAGCATGTC 476
 * * * * * * * * * * * * * * * *

cSizzled AGACCTGCCAGCAGTGGAGAACTCTTACGCACAAAAGACTTCTGAAGTTTCTGTG 533
xSizzled AGGGCTGCCACTTATTGAAGAATTCTTTTACACAAGACAGTCTTGAAGCTTTTGTG 533
zSizzled AGAGCTGTCCATCAGTCCAGGAGTCTCCGTCACTCAAACCTGCTGGACTCGCTCTGCC 536
 ** *** * * * * * * * * * *

cSizzled ACAGTAATTCGCGAGTAAAGTAAAGCTGTCCAAAAAAGAGCAGTAATCGGCGACCAAG 593
xSizzled ACAATAACTTTGCTGTATAAGTAAAGTTGGCAAAGAAGAAAACAACTTCAGGACTTCATG 593
zSizzled TCAACGACTTCGCGGTGAAGGTGAAGATCATGCGTCGGCGTGTGCCGTCTTCCGAGCCGG 596
 ** * ** ** ** ** * *

cSizzled AGTACAGCATTGAATGCCATGTGGAATTCATTACCCAGGGCTCACTCTTGCCTTATGAAA 653
xSizzled AATATGAGACCGAAGGCCAGTTGAGTTCATTAACAAGGTCTGCTCCTTCCATATGACA 653
zSizzled AGTTTACAGTAGAGGGCGCTGTGGAGCTGATCGAGCGCGGGCCGCTAATGCCCTATGACA 656
 * * ** ** ** * ** * ** ** *

cSizzled CTCAGCACATGATACAGCAATGGCTGCTCATCAATGAAAAGTACACAGAGGATGACTC 713
xSizzled CACGTACCATGATTGAACAGTGGCTGCTGATTAATGAGAATTGTGCTCAGAAGCTGATAC 713
zSizzled CCGCTAGTCTGCTGCAGCGCTGGATGCTAATCAACCTCCGCTGTCGCATGCGCTAGTCA 716
 * ** * * ** ** ** ** ** **

cSizzled AAACCCATCGTCTACGGTGTATCTCCTTGTAGGAAGAT---TGAGGAGGTATCATTT 770
xSizzled GGA---ACAGACCCACAGTGTATGTTATTGCTGGTGACAT---CCATCATGAAAAGGTTA 767
zSizzled GACCCGGCCGTGCGCAGTTATACCTCATCACCGGGAAAATGCGTGCTGGTGGATCCATCG 776
 * * * ** * * ** * ** **

cSizzled TAGTAAATCAGATTTATCTGCGAGAGGAGGACTCCCAGCTGACTTTGGCCACTCAGA 830
xSizzled AAGTCAACAGGGTTTCCACTGGCAGAAAAAGACTCTCAGCTGACACTTGCCACAAGGA 827
zSizzled AGATCGCTAATCTGTTCCCGTGGCTGAAGAAAGACTTGCACATCGCCACGCAACACGCA 836
 * * * * ** ** * ** ** ** *

cSizzled AGTGGAGGTACCATAAATGCTTGTAATATTTA---TCGTATTACT---TGTAAGAA-GC 883
xSizzled GGTGGAGACACCATAAATGTTAATACAGTTCTT---GTACTTCACTGTATGTAATACAC 884
zSizzled AGTGGAAACACTACAAGTGCTGAGAGAAAGCGCAACTTATGTATATATTTATAAAATAT 896
 ***** ** * ** ** * * * * *

cSizzled TTATTACACTTCTTATGCCG-AACTTATCTTGTAATAAGAATGTAC-CATAAGTGGCAT 941
xSizzled AAGGCACTCTTTTTTAAAG-GACTATAATATATATATATATATATATATATATA 943
zSizzled AGAAAAAGACTTTGAAGAGTGATGTGAAGTCCAGATGTTGAGCTTT-TATTTCACTATG 955
 * ** * * * * ** * *

cSizzled GTAAATCTTTGTTTCCTTTTAACTGTATTATAAATGAACTTAGATCCAGTGTCATCA 1001
xSizzled GTAAACATAAAGACTTATTATAACAGCTGGATTGAGCGCATCCATTACCATGC--TGA 1001
zSizzled TTGACGTACT---TCCAAGTAAAGTGAATATTAAGCAGGGGGTGGGGCTTATTTTGC 1012
 * * * ** * * * *

cSizzled GGCCTACTTTCTA-CAGTATTTAGCTATT-TGTGAA----GTTTAACTTGGTAA---- 1051
xSizzled AGAGGAAATACTA-TAAATTCAGCAATTATGAACATTGTATAAACTGAGCAAATAT 1060
zSizzled GCATCATCTACTAGTAGCAATCTAACTGTAAGAGGGGCGTGGCTACAAATAAGAGGG--G 1070

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库